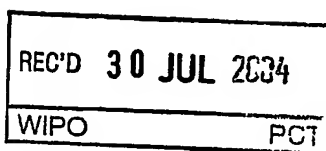


PCT/HU2004/000063



MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

ELSŐBBSÉGI TANÚSÍTVÁNY

Ügyszám: P0301909

A Magyar Szabadalmi Hivatal tanúsítja, hogy

Soméus Edward, Budapest,

Magyarországon

2003. 06. 23. napján 23700/03 iktatószám alatt,

Eljárás csontszén hordozóhoz kötött mikroorganizmusok szilárd fermentációjára, granulált készítmények előállítására, tárolására és alkalmazásaira

című találmányt jelentett be szabadalmazásra.

Az idefűzött másolat a bejelentéssel egyidejűleg benyújtott melléklettel mindenben megegyezik.

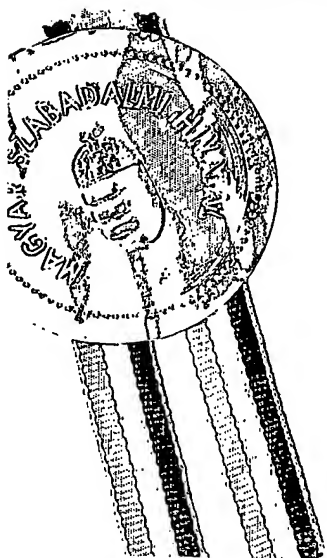
Budapest, 2004. év 07. hó 13. napján

Szabó Emilné
A kiadmány hitelül: Szabó Emilné osztályvezető-helyettes

The Hungarian Patent Office certifies in this priority certificate that the said applicant(s) filed a patent application at the specified date under the indicated title, application number and registration number. The attached photocopy is a true copy of specification filed with the application.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY



Eljárás csontszén hordozóhoz kötött mikroorganizmusok szilárd fermentációjára,
granulált készítményének előállítására, tárolására és alkalmazásaira

Feltaláló és bejelentő:

Someus Edward (Budapest)

Bejelentés napja:

2003 június 23.

A találmány tárgya eljárás mikroorganizmusok állati eredetű csontszénhez - kétlépéses folyadék-szilárd fermentációval - kötött granulált készítményének előállítására, tárolására és alkalmazásaira vonatkozik.

A „mikrobiális konzorcium” megjelölésen a természetes talaj mikroorganizmusok együttes alkalmazását értjük egymás hatásának növelése céljából.

A „granulált mikrobiális készítmény” és/vagy „mikrobiális oltóanyag” megjelöléseken azt értjük, hogy olyan szelektált természetes talaj mikroorganizmusok tiszta, vagy kevert konzorcionális tenyészetét rögzítjük a hordozó belső felületéhez és/vagy pórusaiba, mely mikroorganizmusok a hordozó foszfor tartalmát más élőlények számára folyamatosan hozzáférhetővé teszik.

A „hordozó” megjelöléseken azt értjük, hogy állati eredetű steril csontszén alkalmazunk latinul „*carbo animalis*”, mely foszfor és kalciumtartalmú, stabil szerkezetű, makroporózus jellegű és előnyös védelmet biztosít a betelepült mikroorganizmusok számára.

A „biofilm” megjelöléseken azt értjük, hogy szilárd és nagy felszínű hordozó közelébe kerülő mikroorganizmusok először egy gyors, passzív adhézión folyamat eredményeképpen kölcsönhatásba lépnek a felszínnel, ezt a fizikai kölcsönhatást egy aktív, a mikroorganizmus termelte exopolimer molekulák közvetítette aktív kötődés követi, megteremtve a biológiai és fiziko-kémiai együttműködés feltételeit. A felszínhez való kötődés és az azon történő növekedés eredményeképpen végül is egy aktív biofilm réteg alakul ki a részecske felszínén, amely több mikroorganizmus fajt is tartalmazhat a felszín és a környezet-sajátságaiának megfelelően.

A „kiválasztott mikroorganizmus” megjelöléseken minden olyan baktériumot és mikro gombát értünk, melyek az emberre és/vagy állatra és/vagy növényre nem fejtenek ki patogén hatást, növekedésre illetve foszforban és kalciumban gazdag közegben spórázásra is képesek, valamint a sikeres rögzülés érdekében képesek a hordozó belső felületére nőni.

Az „immobilizáció” megjelölésen a spóra formájában nyugvó mikroorganizmusok hordozóhoz két lépésben - folyadék fázisú fermentáció, szilárd fázisú fermentáció és víztelenítés - történő rögzítését értjük, mely biztosítja a mikrobiális oltóanyag hosszú távú, és hűtés nélküli tárolhatóságát.

Az „aktiválás” megjelölésen azt értjük, hogy a nyugvó immobilizált sejtekben – steril folyadékkal történő rehidratációval valamint tápanyag adagolásával – az inaktív spóra vegetatív sejté való átalakulását indukáljuk.

A „biológiai növényvédelem” megjelölésen azt értjük, hogy a hordozó és mikrobiális oltóanyag növényi talajpatogének ellen eredményesen alkalmazható, mely hatást tovább erősíti a rögzített mikroorganizmus és a hordozó között kialakuló biológiai és fiziko-kémiai együtthatás.

A „revitalizáció” megjelölésen a bioszféra természetes egyensúlyának helyreállítását és/vagy megőrzését értjük, beleértve, de nem lehatárolva, a talajszennyeződések lebontását és/vagy a talajélet fokozását és/vagy a talaj foszfor feltöltését és/vagy használt adszorbensek biológiai regenerálását célzó alkalmazásokat is.

A „CFU/g” megjelölésen a kolóniaképző sejtszám per gramm értéket értjük.

A „biogazdálkodás” és/vagy „ökológiai termesztés” megjelölésen azt a termesztési módot értjük, amely során kerülnek a mesterségesen előállított műtrágyák, növényvédőszeresek és növekedéserkentők alkalmazását. A biogazdálkodás során olyan anyagok és eljárások alkalmaznak, melyek elősegítik a természetes ökológiai egyensúly fenntartását és a mezőgazdasági termesztést ökológiai egységbe integrálják.

Az „alacsony környezeti terhelésű gazdálkodás” kifejezésen a mezőgazdasági melléktermékek olyan optimalizált felhasználását értjük, mellyel a mesterségesen előállított anyagok (növényvédőszeresek, műtrágyák) használata minimálisra csökkenthető, megakadályozható a felszíni és a felszín alatti vizek szennyeződése, csökkenthető a növényvédőszermaradékok élelmiszerekben történő megjelenése és csökkenthető a gazdálkodó környezeti kockázata.

Az „együtthatás” megjelölésen azt értjük, hogy a mikroorganizmusok és a foszfor tartalmú hordozó, illetve a körülöttük lévő bioszféra között biológiai és/vagy fiziko-kémiai folyamatok jönnek létre, mely során a foszfor biológiai hozzáférhetősége növekszik.

A „foszfor híd” megjelölésen azt értjük, hogy a foszfortartalmú hordozóhoz kötött mikroorganizmusok savtermelése és együtthatása folytán a növények számára

biológiaiilag hozzáférhető foszfor és kalcium jut a rizoszférába, mely során biológiai foszforhíd alakul ki a hordozó – mikroorganizmusok- növény között.

A „steril” megjelölésen azt értjük, hogy a hordozó bármilyen élő anyagtól mentes a mikroorganizmusok rögzítése előtt. A folyadék fázisú fermentációval kizárólag a szelektált és immobilizálendő mikroorganizmus törzseket és/vagy konzorciumot állítjuk elő, mely mentes minden más élő anyagtól mentes.

A „fél-steril” vagy „részlegesen steril” megjelölésen azt értjük, hogy a hordozó steril, és a paraméterek megfelelő optimalizálásával azt kell elérni, hogy a levegőből történő fertőződés ne következzen be a szilárd fázisú fermentáció és dehidratálás folyamata során.

A „stabil szerkezet” megjelölésen azt értjük, hogy nem alakváltoztató hordozót választunk a mikroorganizmusok előnyösebb védő-hordozó felülethez kötésére.

Az „aktivált szilárd szubsztrát fermentáció” kifejezés alatt olyan egy vagy kétfázisú eljárást értünk, mely egy hagyományos folyadékfázisú fermentációból és az innovatív szilárd fázisú fermentációs eljárásból áll, nagy mennyiségű spóra előállítását és a mikroorganizmusok hordozóba történő rögzítését célozva. Az egyfázisú szilárd fermentáció előnyösen magába foglalhatja a folyadékfázisú fermentációs is.

A „szilárd fermentáció” megjelölésen azt értjük, hogy a mikroorganizmus a hordozó felületéhez történő kötésének folyamatai alkalmazás célirányosan mesterségesen vagy természetes úton történik.

A „hatékony tárolás” megjelölésen azt értjük, hogy 35 Celsius fok alatti anyag mag hőmérsékleten fagyasztás nélkül hosszú távon történő életképesség megőrző tárolás történik nyugvó dehidratált, spórák állapotban.

Az „dehidratálás” megjelölésen azt értjük, hogy a granulált mikrobiális készítmény nedvességtartalmát 35 súlyszázalék alá csökkentjük.

Az „rehidratálás” megjelölésen azt értjük, hogy a granulált mikrobiális készítmény nedvességtartalmát 35 súlyszázalék fölé növeljük.

A „szennyezőanyagok” megjelölésen mindazon mesterségesen előállított, alkalmazott és/vagy természetesen előforduló anyagokat és ezek bármely kombinációját illetve újrakombinációját értjük, melyek az ember, állat és/vagy növény biológiai életterébe és a környezetbe kerülve közvetlen vagy közvetett módon a bioszféra bármely elemére káros hatást fejtenek ki, illetve ennek kockázata fennáll.

Az „alkalmazások” megjelölésen mindazon ipari és/vagy mezőgazdasági és/vagy környezetvédelmi alkalmazásokat értjük, mely esetekben állati eredetű csontszén és/vagy foszfortartalmú hordozó anyagot használunk, és a hordozó felületén a mikrobiális konzorcium kialakulása vagy alkalmazás célirányosan mesterséges szilárd fermentáció útján és/vagy a talajba és/vagy a talajvízbe történő adaptálás után természetes úton történik.

Közismert, hogy a környezetben használt kemikáliák és a vegyszeres talajfertőtlenítés nem kellően szelektív módszer, nem csak a patogén mikroorganizmusokat, hanem a talaj élet és a tápanyagok körforgása szempontjából hasznos szaprofita mikroorganizmusokat, a növények természetes védekező mechanizmusában jelentős szerepet játszó antagonista szervezeteket valamint a magasabb rendű élőlényeket is elpusztítja. Ez a talajélet jelentős csökkenését eredményezi, ami a termesztett növényekre, azok tápanyagforgalmára is kedvezőtlen hatású.

A talajpatogének természetes antagonista mikroorganizmusok ellenségeinek gátlása/elpusztítása miatt a talaj érzékenyebbé válik a kívülről bekerülő patogénnel szemben. A vegyszeres kezelések hatására a talaj természetes védekező rendszere jelentős mértékben károsodik, ami maga után vonja a patogének szélesebb körű megjelenését. A növényi patogének és kártevők által okozott problémák a peszticid használat következtében tehát sokszor tovább súlyosbodnak.

A nagy mennyiségben használt növényvédőszeres és/vagy a humán egészségre és/vagy más élőlényekre káros, mesterségesen előállított és/vagy természetesen előforduló szennyezőanyagok a talajban és a talajvízben felhalmozódhatnak. Ezen folyamat során a mikroorganizmusok szennyezőanyagokkal szembeni rezisztenciája fokozódhat, a kártevők ellenállóbb változatai jelennek meg és erősen rezisztens szervezetek is kialakulhatnak. A rezisztencia spirálszerűen újabb és újabb növényvédőszeres kifejlesztését igényli, s ez beláthatatlan és ellenőrizhetetlen veszélyt jelent a környezetre és az élelmiszerlánc alapjaira. Gondot okozhat a növényvédőszeres együttes hatása is, amikor egy területen, vagy egy terméken több agro kemikália hatása egyszerre érvényesül. A növényvédő szeres általában rövidtávon sikeresnek mutatkoznak, huzamosabb alkalmazásuk során azonban számos környezetvédelmi és egészségvédelmi probléma jelentkezik. Ökológiai szempontból a növényvédő szeres alkalmazása romboló beavatkozás az életközösségek belső kapcsolataiba.

Közismert, hogy a tápanyag visszapótlás a talaj termőképességének és biológiai aktivitásának fenntartására, illetve növelésére, pillangós virágú-, zöldtrágya- vagy mélyen gyökerező növények vetésforgóban történő termesztésével és vetésforgóval, minősített komposztált szerves anyag és a komposzt, vagy a talaj aktiválására megfelelő mikroorganizmusok, vagy növényi alapú készítmények talajba juttatásával történik, mely készítmények foszfor tartalma alacsony. A műtrágyák foszfor hatóanyag tartalma jellemzően 19% ugyan, de alkalmazásuk hátrányos, mivel nehézfémeket tartalmazhatnak, növelik a talaj savasságát, a foszfor biológiai hozzáférhetősége alacsony és ennek megfelelően nem alakulhat ki biológiai együttműködés és foszforhíd. A talaj kezelésre használható mikroorganizmus-kultúrák jellemzően a *Azospirillum brasiliense*, *Bacterium megatherium*, *Azobakter agile*, *Azobacter vinelandii*, *Clostridium pasteurianum* és a *Rhizobium spp.* Törzsek, melyek alkalmazása hordozó nélkül alacsony hatásfokú csekély túlélési százalék eséllyel az amúgy is alacsony kihelyezett sejtszám per gramm talajra vontakoztatva.

Közismert az ökológiai gazdálkodásban engedélyezett készítmények listája, mely szerint megállapíthatjuk, hogy a természetes foszfor feltöltésére, utánpótlására, mobilizálására - technikai és költség szempontból egyaránt - hatékony készítmény nem ismeretes, annak ellenére, hogy a talajgazdálkodás legfontosabb hiányanyaga a természetes foszfor. Az ismert készítmények nem rendelkeznek plasztikus ökológiai adaptációval és tulajdonságokkal, mely alkalmassá teszi a tradicionális és az ökológiai termesztésben jellemzően előforduló széles gazdanövénykörű, talajlakó, növénykórokozó gombák elleni védelemre.

Ismeretes, hogy a mikrobiális oltóanyagok – melyek nem tartalmaznak megfelelő hordozó közeget - hűtve tárolhatók, mely költséges és hűtés során a biológiai anyag életképessége részlegesen csökkenhet. Úgyszintén ismeretes, hogy a mikrobiális oltóanyagok megfelelő védő és hordozó közeg nélküli terepi alkalmazásaik bevezető kritikus fázisának túlélési esélyei rendkívül alacsonyak, tehát a célfeladat hatékonysága nem megfelelő. Úgyszintén ismeretes, hogy különböző mesterséges és természetes hordozó közegeket alkalmaztak mikrobiális oltóanyagok befoglalására, ám ezen ismert anyagok elsősorban laboratóriumi körülményekre lettek kifejlesztve és alkalmazva, de nem jött létre a terepi alkalmazás során a túlélést és hatékony működést biztosító mikrobiális oltóanyag-hordozó-természetes közeg komplex biológiai és fiziko-kémiai együttműködés, mely oly fontos a fenntartható talajélet illetve biológiai, elsősorban

mikrobiológiai sokféleség, számára. A megfelelő mikrobiális oltóanyag kiválasztásától a hatékony terepi alkalmazásig egy rendkívül komplex biológiai és fiziko-kémiai folyamat megy végbe, melynél biológiai és fiziko-kémiai együttthatás az ismert eljárásoknál nem jön létre.

Közismert, hogy a mikrobiológiai készítményeket szerves vegyületek és/vagy halogénezett szerves vegyületek talajszennyeződéseinek biológiai bontására is alkalmaznak, de ezen esetekben a bioremediációs készítmények használatánál az alkalmazás első fázisában még akkor is eredménytelenséget okozó jelentős veszteségek vannak, ha a kezelt talaj természetén mikrobiális állománya lett felerősítve. A laboratóriumban hatékony mikrobiális törzsek szabadföldi alkalmazásban sokszor eredménytelennek bizonyulnak, melynek oka, hogy a mikroorganizmusok nem tudnak kellő hatékonysággal megtelepedni a talajban, illetve a rizoszférában. A védő és hordozó közeg hiányában már a beoltás első fázisát sem élik túl a mikroorganizmusok.

A PCT WO96/37433 (1996.11.28) szerint az állati csont szenesítését követően a csontszénben lévő apatit az első kezelési fázisban savas feltárással, míg a második fázisban alkáli oldattal semlegesítésre kerül a csontban lévő vízzoldható apatit anyag kiválasztása céljából. Az eljárás hátránya, hogy a savas és lúgos vegyi kezelés az anyagot fizikai, kémiai és biológia szempontból alkalmatlanná teszi életképességüket megőrző mikrobiális oltóanyagok befogadására és tárolására, illetve a feltárást oly gyorsított mértékű vízzoldhatóságot eredményez, hogy az anyag hatékony mezőgazdasági biogazdálkodásra alkalmatlanná válik.

A EP 0 104 571 (1983.09.19) szerint biokatalitikus enzim kerül immobilizálásra granulált aktív szén felületen. Az eljárás hátránya, hogy csak fizikai tulajdonságokat változtat meg, az aktív szén magas fajlagos felülete talaj környezetbe kijuttatva kémiaiag agresszív és a hordozó biológiai együtttható tényezője nem lehetséges.

A PCT WO 00/06711 (2000.02.10) szerint mikroorganizmusok vagy enzim kerülnek immobilizálásra porózus üvegen és/vagy termikusan előkezelt diatómafüldön. Az eljárás hátránya, hogy a hordozó és mikroorganizmusok biológiai együttthatása nem válik lehetségessé, a mikroorganizmusok életképessége jelentősen csökken és a hordozók szervesetlen alkotóelemei talajba kerülve a biológiai körfolyamat számára hosszú távon sem férhetők hozzá, így a fenntartható mezőgazdasági biogazdálkodásban nem alkalmazhatók.

A PCT/GB94/00811 (1993.04.23) szerint a nyugalmi állapotú mikrobacejtek szárított mátrix kompozíció, Gram-negatív baktériumsejteket tartalmaz, mely aktiválási hőmérséklete magasabb a kompozíció tárolási hőmérsékleténél. Az eljárás hátránya, hogy a mikroorganizmusok tárolása az alkalmazásnál alacsonyabb hőmérsékleten történik, vagyis hűtés szükséges, aktiválásuk során védve nincsenek, biológiai együtthatas a kalcium és foszfor tartalmú hordozóval nem lehetséges.

A HU 195 614 B (1984.10.29) szerint a *Streptomyces griseoviridis* sugárgomba spórák tápoldatban tenyésztett vizes oldatát hozzák létre, majd lecentrifugálják és a pépet mínusz 20-tól plusz 4 Celsius fok közötti hőmérsékleten zacskóban tárolják. A megfelelő hordozóközeg nélküli eljárás hátránya, hogy a mikroorganizmusok terepi alkalmazásuk első és kritikus fázisa során védtelenek, ezért nehezen és alacsony hatásfokkal aktiválhatók, túlélésükre az esély igen csekély és az anyagot csak hűtve lehet tárolni.

A HU 215 553 B (1994.07.28) szerint a víz oldható szilárd vagy folyékony tápközegek illetve hordozóanyagok AB-041 *Streptomyces sp* antibiotikumot tartalmaznak, további hatóanyagokkal és adalékanyagokkal keverve. Az eljárás hátránya, hogy az AB-041 herbicid biológiai aktivitását csak komplex vízoldható szilárd vagy folyékony tápközegek illetve hordozóanyagok segítségével lehet elérni, mely anyag hűtés nélkül nem tárolható, a vízoldhatóság miatt az anyag aktiválásuk kritikus fázisában már nincs védve és a biológiai – fiziko – kémiai együtthatas a hordozóval nem lehetséges. Hasonló az eredmény a HU 213 919 B (1991.11.28) szabadalom esetén is.

A HU 210 214 A (1995.07.28) szerint a fermentációs eljárás fermentáló biológiai anyag és a biológiai anyag számára nitrogénforrásként hasznosítható, vízben nem vagy gyengén oldódó szilárd szerves tápanyagkomponensok együttese, mely szerint a porózus biokatalizátor cellulóz gyöngyökbe zárt szilárd szerves és tápanyagkomponensek hozzáférhetők a fermentáló biológiai anyag számára. Az eljárás hátránya, hogy a szintetikus cellulózgyöngy hordozó a fenntartható mezőgazdasági biogazdálkodásban nem alkalmazható, a szubsztrátum hűtés nélkül nem tárolható és biológiai – fiziko – kémiai együtthatas a hordozóval nem lehetséges.

A HU 214 917 B (1997.08.28) szerint a találmány tárgya granulált készítmény, amely 50-99 tömeg% finom eloszlású vízoldhatatlan szerves vagy szerves szubsztrátumból és egy mikrororganizmusokat tartalmazó víz oldható szintetikus vagy természetes polimer rétegből áll. Az eljárás hátránya, hogy a szubsztrátum hűtés nélkül nem

tárolható és biológiai – fiziko – kémiai együttthatás a hordozókkal (ásványi agyag, stilikagél, porított mész, diatómaföld stb.) nem lehetséges.

Megállapítottuk, hogy a találmány tárgya teljes mértékben eltér az eddig ismert eljárásoktól és készítményektől és jellegénél fogva jelentős előnyökkel rendelkezik más eljárásokkal szemben.

A technika állása eddig nem ismert olyan mikrobiális oltóanyagok hatékony életképesség megőrző tárolására és talaj revitalizációs alkalmazásaira vonatkozó együttes eljárást és granulátum készítményt, mely során a hordozó anyag aktívan segítette elő a biológiai és fiziko-kémiai együttthatást és a beültetett mikrobák biológiai aktivitásuk során mobilizálják a hordozó foszfor és kalcium tartalmát.

A találmány szerinti eljárás azon felismerésen alapszik, hogy ha foszfor tartalmú makroporózus természetes hordozó külső és belső felületére célirányosan kiválasztott mikroorganizmusokat rögzítünk, majd spóráztatjuk, akkor életképesség megőrző előnyös tárolási körülményt érünk el és alkalmazások során biológiai és/vagy fiziko-kémiai együttthatásra alkalmas plasztikus ökológiai adaptációval rendelkező hatékony természetes granulátum készítményt állíthatunk elő. A hordozó külső és/vagy belső felületén adaptálás után természetes úton is rögzülhetnek a természetes közegben lévő mikroroganizmusok, mely folyamatot előnyösen befolyásolhatunk a hordozó fiziko - kémiai tulajdonságainak változtatásával. Ennek megfelelően az állati csont eredetű foszfor tartalmú szén hordozó anyag előnyös szemcsemérete 0,001 mm – 10 mm közötti, amely steril, szerkezete a tíz nanométer és hatvanezer nanométer közötti tartományban makroporozus, fajlagos felülete grammonként legalább 1 m² de nem több, mint 500 m² és nem tartalmaz olyan anyagokat melyek jelentős mértékben gátolhatják a mikrobiális tevékenységet.

A találmány tárgya szerinti granulált mikrobiális készítmények porózus hordozón tárolható életképesség megőrző immobilizálására vonatkozik, mely szerint olyan törzset, törzseket és/ vagy mutansát, mutánsait állítjuk elő folyadék – szilárd fermentációval, mely bejutattva a foszfor tartalmú hordozó anyagba melyek spóráképzésre alkalmasak és 35 Celsius fok alatti anyag mag hőmérsékleten, hosszú távon életképesen védett tárolásra, majd terepi aktiválásakor a hordozóval komplex biológiai és fiziko-kémiai együttthatásra is alkalmasak.

A találmány továbbá eljárás, mely szerint olyan talajlakó mikroorganizmus tenyészeit szelektáljuk melyek együttesen vagy külön- külön kötve a biológiai és fiziko-kémiai

együtthatásra alkalmas védő hordozóhoz növényi talajpatogének ellen és/vagy szerves vegyületek és/vagy halogénezett szerves vegyületekkel szennyezett talaj gyorsított és hatékony biológiai kármentesítésére és/vagy használt aktív szén biológiai regenerálására is alkalmazható.

A találmány tárgyát képező eljárás és granulátum hordozó készítmény a mikrobiológiai törzsek optimalizált befogadását, tárolását és széleskörű biotechnológiai célokra történő együtthatás alapon történő alkalmazhatóságát célozzák meg, melyet a kiválasztott alapanyagok típusai és az előállítás módszerei biztosítják. Ezeket a tulajdonságokat az előállításnál felhasznált alapanyag típusa és a gyártástechnológia együttes megválasztásával tág határok között változtathatjuk meg, azaz a hordozó pólusméret térfogatát és eloszlását, fajlagos felületét, felületének kémiai jellemét és szemcseméret eloszlását a specifikus biotechnológiai feladat követelményei szerint alakíthatjuk ki.

A hordozó előállításának az első lépésében a foszfor tartalmú alapanyagot levegőtől elzárt térben, legalább öt Pascal elszívási nyomás értéken, olyan hőmérsékleten szeszesítjük mely hőkezelés során az illékony szerves komponensek és/vagy prionfehérjék (proteiniaceous infectious particle) teljes mértékű és minden körülmények közötti lebomlását és az anyagból eltávolítását és kigázosítását érjük el, mely szerint az anyagot előnyösen 500 Celsius fok és 1000 Celsius fok anyag maghőmérséklet közötti hőfokon, előnyösen 850 Celsius fok, anyag maghőmérsékleten, legalább 30 perces időtartam alatt szeszesítjük. A szilárd anyag szénttartalmát, illetve csont esetén a benne lévő inorganikus foszfor, kalcium és szén bázisú vázszerkezetet, alkalmazási igénynek megfelelően katalitikus hőkezeléssel 5 % szénttartalom alá csökkenthetjük. A kezelés során a szilárd szénváz határrétegében a szénttartalom egy része gázalakú terméké alakul, elgázosodik illetve kiég, mely folyamat a kezelés időtartam alatt növekedésével növeli a pórustérfogatot is. A kiégetett szénrészek helyén alakul ki a hordozó sajátos pórusrendszere. A szabadalom szerinti hordozó előállítás során a csontban lévő hydroxyapatit fajlagos felülete a hőkezelés hatására megnövekszik és együttesen a szénnel közvetlen adszorpciós feladatokra hozzáférhetővé válik. Evvel egy komplex mechanizmus alakul ki, mely kémiai, fizikai és kation - anion cserélő hatású is egyben, lehetővé téve a biológiai együtthatás kialakulását. A kezelés hőmérséklet tartományát 500 Celsius fok feletti anyag maghőmérsékleten végezzük, valamint a hőkezelés időtartamát a hordozóhoz kötésre kerülő mikroorganizmus vagy mikroorganizmusok

környezeti igényeinek előnyös módon választjuk meg, mellyel szabályozhatjuk a pórustérfogatot, a fajlagos felületet és a hordozó széntartalmát is.

Amennyiben már kész makroporozus szerkezettel rendelkező hordozóanyag áll rendelkezünkre, úgy a sterilizálást nem feltétlenül hőkezeléssel szükséges elvégezni, hanem ismert eljárással felhasználás előtt hőkezelés nélkül sterilizáljuk a hordozót. Az ily módon előkészített granulátum hordozót, amennyiben szükséges, steril előállítási körülmények között 35 Celsius fok anyag maghőmérséklet alá hűtjük közvetlenül és/vagy szilárd fermentáció után alkamazzuk.

A mikrobiológiai preparátum rögzítésének első lépése a megfelelő törzsek talajból történő izolálása és kiválasztása ismert mikrobiológiai eljárásokkal.

A mikroorganizmusok kiválasztására előnyösen az alábbi kritériumok alkalmazása célszerű, mely szerint a mikrobiális törzs humán, állat és/vagy növény vonatkozásában nem patogén jellegű és/vagy képes növekedni a hordozó belső felületén és pórusaiban és/vagy hatékony valamilyen gazdasági szempontból fontos talajlakó növénykórokozó ellen és/vagy alkalmas szerves és/vagy halogénezett szerves vegyületekkel szennyezett talajok kármentesítésére és/vagy alkalmas biológiai vízkezelésre és/vagy alkalmas szennyezett adszorbens biológiai regenerálására és/vagy szennyezőanyag megkötésére.

A kiválasztott mikrobiális törzs és/vagy konzorcium rögzítése egy vagy kétlépcsős eljárással történik, mely során az első lépésben hagyományos folyadék fázisú fermentációs eljárást, majd ezután a második lépcsőben egy innovatív szilárd szubsztrát fermentációs eljárást alkalmazunk, illetve a két folyamat a szilárd szubsztrát fermentációval egy lépcsőben egy rendszerben is elvégezhető. A szilárd szubsztrát fermentációs eljárás alkalmas jó minőségű spórák nagy mennyiségben történő előállítására, és elősegíti a kiválasztott mikrobiális törzsek és/vagy konzorcium megfelelő szerves és vagy szervetlen hordozó belső felületén történő növekedését és rögzülését.

A folyadék fázisú fermentáció szerepe az aktivált szilárd szubsztrát fermentációs eljáráshoz szükséges innokulum előállítása. A folyadék fázisú fermentáció tehát úgy van optimalizálva, hogy alkalmas legyen a kiválasztott mikrobiális törzsek és/vagy konzorcium vegetatív sejtjeinek hatékony előállítására.

Bármely alkalmazás esetében a sikeres mikrobiális növekedés elősegítés érdekében a hordozót tápanyaggal is impregnálhatjuk. Az alkalmazott tápanyag típusát és koncentrációját az egyes mikroorganizmusok és/vagy mikrobiális konzorcium a

hordozó belső felületén való rögzüléshez, növekedéshez és spórázásához szükséges tápanyagigénye, valamint e tápanyagok adszorpció s rátája határozza meg.

Az immobilizáció következő lépéseként homogénen elosztatjuk az inokulumot, melyet hagyományos folyadék fázisú fermentációval állítunk elő, a szilárd hordozót tartalmazó ágyazaton abból a célból, hogy a mikroorganizmusok a hordozó belső felületén szaporodjanak, spórázásuk meginduljon és fixen rögzüljenek.

Mikrobiális konzorcium rögzítése során úgy járunk el, hogy minden egyes mikrobiális törzsnek elkülönített szilárd ágyat alakítunk ki.

A szilárd szubsztrát fermentáció legfontosabb paramétereit (nedvesség, pH, levegőztetés, hőmérséklet, tápanyagok) az alábbiak megfelelően optimalizálhatjuk:

(a) a szilárd szubsztrát fermentáció félsteril (a hordozót a hőkezelés után streilnek tekinthetjük, és a paramétereket úgy választjuk meg, hogy a levegőből történő befertőződést elkerüljük), (b) a mikroorganizmusok képesek legyenek növekedésre és spóratermelésre, (c) a folyamat végére legalább 10^8 CFU/g koncentráció értéket érjünk el.

A spórázási körülmények fél sterilek, mely szerint az anyagot legfeljebb 35 Celsius fok alatti anyag mag hőmérsékleten 120 órán belüli időtartamig spóráztatjuk, amíg az aktív mikrobiális anyag legalább 10^8 CFU/g koncentrációt el nem éri. A hordozóanyag kalciumtartalma elősegítheti a spórázási folyamatot. A szilárd hordozó felszínére kötés stabilizált környezetet biztosít a mikroorganizmusok számára, ezért lehetővé válik a steril hordozón lévő spóráztatott sejtek tartós és biológiai aktivitás, illetve életképességét megőrző tárolása.

A mikrobiális anyag előállítása során a folyadék fázisú és a szilárd fázisú fermentációs folyamat között megfelelő léptéknövelést alkalmazunk. A szilárd szubsztrát fermentációt víztelenítés, stabilizálás és nem oxidálódó anyagokkal történő formulázás követi. A formázás parafin olajjal és/vagy növényi olajjal és/vagy különböző cukrokkal és/vagy bentonittal történik. A formázást követően aktív mikrobiális anyag koncentrációja előnyösen: 10^8 CFU/g.

A szilárd fázisú fermentációs eljárással előállított spórák ellenállóbbak, mint ha folyadék fázisú fermentációt alkalmaznánk. Emellett az előnyös fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező szilárd fázisú granulátum hordozó is elősegíti a mikrobiális anyag legalább egy éven keresztül szoba hőmérsékleten történő hatékony és életképesség megőrző tárolását.

Az anyag felhasználás előtt könnyen újra aktiválható, mely a mikrobiális anyagok terepi alkalmazásait kedvezően befolyásolja és leegyszerűsíti.

Az aktiválás csíra- és mikrobiális aktivitást gátló anyagoktól mentes folyadék és/vagy tápanyag hozzáadásával történik, mely szerint a tárolt és a mobilizáló anyagot összekeverjük, előnyösen egyenlő arányban, majd alkalmazás előtt legalább két órán keresztül állni hagyjuk. A szabadalom tárgyát képező módon a nagy felszínű szilárd és biológiai és fiziko-kémiai együttthatásra alkalmas hordozó a bejutatott vagy természetes módon betelepített mikroorganizmusok számára védett környezetet biztosít. A védett környezetben növekvő mikroorganizmusok vegetatív szaporító sejteket spórákat képeznek és várható, hogy a keletkezett sejtek egy része a tápanyaggal támogatott aktiválás és alkalmazás után a talajban gyorsan adaptálódnak és kolonizálódnak. A mikroorganizmusok továbbterjedését a szilárd hordozóról talajban található víz elősegítheti. Ennek megfelelően a szabadalom tárgyát képező eljárás és hordozó közeg granulátum használatának az alábbi előnyei vannak:

A hordozó jobb védelmet biztosít a talajba juttatott mikroorganizmusok számára. A stabil szerkezetű és speciális fiziko-kémiai tulajdonságokkal rendelkező hordozó belső felületén rögzített mikroorganizmusok túlélési aránya – az alkalmazás első kritikus szakaszában – jelentősen megnő a hordozó nélkül kijutatott mikrobiális oltóanyagokhoz viszonyítva, ahol a kijutást követően a mikroorganizmusok több, mint 90%-a elpusztul.

A biológiai anyag tárolhatóságának javítása, mely során a néhány nap/hét helyett legalább egy éven keresztül hűtés nélküli tárolást érhetünk el úgy, hogy a biológiai anyag megőrzi az életképességét és aktivitását. A mikroorganizmusok a magas foszfor tartalmú hordozó belsejébe történő rögzítése biztosítja, hogy a mikroorganizmusokat szárított és egységes formában tárolhatók továbbá, hogy az életképességüket legalább egy éven keresztül megőrzik.

A hordozó külső és belső felületén kialakuló biofilm növeli a mikrobiális aktivitást és környezeti adaptációs képességét: az aktív, nagy felszínű részecskék közelébe kerülő mikroorganizmusok először egy gyors, passzív adhézión folyamat eredményeképpen kölcsönhatásba lépnek a felszínnel, ezt a fizikai kölcsönhatást egy aktív, a mikroorganizmus termelte exopolimer molekulák közvetítette aktív kötődés követi. Ezt az aktív kötődést a szilárd felszín fiziko - kémiai tulajdonságai és a mikroorganizmus fiziológiai állapota is befolyásolja. A felszínhez való kötődés és az

azon történő növekedés eredményeképpen végül is egy aktív biofilm réteg alakulhat ki a részecske felszínén, amely több baktérium fajt is tartalmazhat a felszín és a környezet sajátosságainak megfelelően.

A foszfor tartalmú makroporozus hordozó egyidejűleg biztosíthatja a felületet a kombinált aerob és anaerob mikroorganizmusok aktivitásához, mivel a hordozó külső felületén aerob környezet van, míg a belső pórusokban az anaerob mikroorganizmusok számára kedvező oxigén szegény régió alakul ki. A csontszén hordozó pórusos szerkezetéből adódóan összetett hatású egységeket tudunk tehát kialakítani, amelyek külső rétegében az aerob mikroorganizmusok aktivitásához és szaporodásához szükséges aerob környezet uralkodik, a belső pórusokhoz viszont egyre kevesebb oxigén juthat, mivel a bediffundáló oxigént a külső, oxigénfogyasztó mikrobák felhasználják.

A talaj termőképességének természetes javítása folyamatos kalcium és foszfor ellátással. Az állati csontszén foszfor tartalma - a mikroorganizmusok aktivitása következtében - folyamatosan a növények számára felvehető formába alakul át és szabadul fel. A természetes eredetű anyag megakadályozza a talajban fellépő időszakos foszfor hiányt és kiválthatók vele a mesterséges eredtű műtrágyák, melyek számtalan kedvezőtlen környezeti hatással rendelkeznek. A növények számára hasznosítható foszfor felszabadulása a csontszén hordozóból időben folyamatos, nem mosódik ki a talajvízbe. Sőt ezen kívül egy stabil kölcsönhatás alakul ki a mikroorganizmus és/vagy mikrobiális konzorcium és a csontszénhordozó valamint a növények rizoszférája között és a talaj élő, szerves és szervetlen összetevői között. A természetes, negatív környezeti hatásoktól mentes és biológiailag folyamatosan hozzáférhető foszfor feltöltés és a biológiai együtthatás a növény számára minden esetben a legoptimálisabb módon érvényesül és fokozza a növény és a talaj természetes védekező rendszerét.

A porózus hordozó kedvezően befolyásolja a talaj fiziko-kémiai tulajdonságait, megkönnyíti az oltóanyag kijuttatását. A nagy felszínű porózus hordozó talajba történő bevitelének kedvező hatása, hogy javítja a talaj szerkezetét, a kezelendő talajt fellazítja, ezáltal jobb oxigénellátást biztosít a szennyezőanyagok aerob lebontását végző mikroorganizmusok számára. A hordozó tipikus előállításának kiindulási alapanyaga az állati csont, melyet a hordozó előállítása során magas hőmérsékleten termikusan kezelünk. Az állati csontszénhordozó csak körülbelül 4 – 18 súly% szenet tartalmaz, fő tömege kalcium-foszfátból áll. A hordozó kalcium és foszfor tartalma a

mikroorganizmusok aktivitásának eredményeként lassan mobilizálódik, ezáltal a rizoszférában növények számára felvehetővé válik. Közvetlen fiziko-kémiai és biológiai együttthatás és tápanyag-híd épül ki a rögzített mikroorganizmusok, talaj mikroorganizmusai és a hordozó között. A biológiailag hozzáférhető kalcium és a foszfor talajba történő juttatásán kívül a talaj savanyodás semlegesítő hatással is rendelkezik.

A granulátum készítmény használata nem avatkozik bele a természetes folyamatokba, az ökoszisztémára nézve nem toxikus hatású, nem okoz másodlagos környezetszennyeződést, illetve idővel a talaj természetes alkotóelemévé válik és ennek megfelelően a hordozó talaj és/vagy talajvíz kezeléséhez bármely összefüggésben alkalmazható. A hordozóhoz kötött mikrobiális törzs vagy törzsek plasztikus ökológiai adaptációja növekszik és a hordozó – mikroorganizmusok - növény közötti biológiai együttthatásra alkalmassá válik, szelektíven a talajlakó növénykórokozó gombák. Szelektív hatású, a természetes antagonista szervezeteket nem szorítja vissza, helyreállítja az ökoszisztéma egyensúlyát, fokozza az ökoszisztéma önszabályozó képességét és a biológiai sokféleséget valamint helyreállítja a növény természetes védekező rendszerét.

A találmány szerinti eljárás és az előállított granulátum készítmény előnyös alkalmazási területeit az alábbiak szerint adjuk meg anélkül, hogy a jelen tanulmány oltalmi körét korlátoznánk:

hagyományos, alacsony környezeti terhelésű és/vagy a biológiai gazdálkodásban alkalmazott kombinált mezőgazdasági eljárások vonatkozásában úgymint a termőtalaj biológiai és/vagy fiziko-kémiai előnyös együttthatása és/vagy természetes foszfor feltöltése és/vagy biopesticid alkalmazások és/vagy a talaj savasság ellensúlyozására. A magas foszfor és kalcium tartalmú csontszén (amely egyben az előállítási technológiai során sterilizált porózus biopreparátum szilárd hordozó és növényi tápanyag-forrás) felhasználás lehetőséget biztosít a plasztikus ökológiai adaptációval rendelkező (alternatíván savanyú és lúgos pH-jú talajokon is alkalmazható) kombinált biopreparátumok befogadásásra (szelektált antagonista baktérium és gomba törzsek felhasználásával) a nehezen leküzdhető, széles gazdanövénykörű talajlakó növénykórokozó gombák ellen. A granulátum készítménnyel a talaj fertőtlenítése (talajpatogének talajpopulációjának természetes redukálása) a növények föld alatti részeit támadó parazita mikroorganizmusok ellen is hatékony, és/vagy

szerves vegyületekkel és/vagy halogénezett szerves vegyületekkel szennyezett talaj gyorsított és hatékony biológiai kármentesítésre, és/vagy

szennyezett talajvíz, felszíni víz, szennyvíz és/vagy ipari víz illetve folyadék tisztító berendezések aktivált szűrőjeként, és/vagy

szerves vegyületekkel és/vagy halogénezett szerves vegyületekkel szennyezett adszorbensek biológiai regenerálására, és/vagy

permeabilis aktív részalként talajvíz szint alatti vízáram ellenirányában épített gát építésére, nehézfém-szennyeződések, radioaktív elemek és/vagy komplex vegyi szennyeződések megkötésére, előnyösen más anyagokkal, úgymint például zeolittal történő együttes alkalmazással, és/vagy

a találmány továbbá előnyös minden olyan alkalmazási területeken, ahol a foszfor és a mikrobiológiai anyagok együttes jelenléte szükséges az alkalmazási közegben végbemenő fiziko-kémiai és/vagy biotechnológia folyamatokhoz.

Az alábbi példákat azért adjuk meg, hogy a találmány szerinti eljárás és granulátum készítményt bemutassuk anélkül, hogy oltalmi körét korlátoznánk:

Üvegházi kísérletet végeztünk az alábbiak szerint: talajból izolált *Streptomyces griseoviridis* kevert tenyészetét a szabadalom leírása szerint előállított 1-2 mm szemcseméretű csontszén hordozón rögzítettük, immobilizáltuk majd 30 napos hűtés nélküli tárolás után hajatott paprika (*Capsicum annuum*) tesztnövény riziszférájába egyenletes eloszlásban juttattuk ki és hatását 90 napig vizsgáltuk. A granulátum készítmény 10^{10} CFU/g koncentráció értékű volt és a tápkocka minden kilogramm talajhoz 2 tömeg % (száraz granulátumra vonatkoztatott) aktivált készítményt adtunk. A kezelések idején és a kezelések után 7-12 naponként (a fertőzéstől függően) értékeltük a fertőzöttség gyakoriságát és intenzitását. A készítmény hatását vizsgáltuk: *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Sclerotinia* spp. Az eredmények alapján megállapítható volt, hogy a készítmény a vizsgált talaj kórokozókkal szemben eredményesnek mutatkozott, mely szerint a kezeletlen növények 80%-ánál a betegségek kialakulás megfigyelhető volt, míg a kezelt növények esetében ez az arány 15% alatt volt. A termésnövekedés vonatkozásában a foszforhíd kialakulásának következtében 45%-os növekedést értünk el.

Magas klóratom számú maradék klórszármazékokkal szennyezett talaj kármentesítési kísérletét végeztünk az alábbiak szerint: talajszint alatti 3-5 méter közötti tartományban mélységi talajszennyezés 3600 mg/kg átlag szennyeződéssel koncentrált

gócponjtait azonosítottuk és lehatároltuk, majd mintavételezéssel adaptálódott mikrobiális törzseket szelektáltunk és aktivált szilárd szubsztrát fermentációval 1-2 mm szemcseméretű csontszén hordozóhoz kötöttünk, majd a 10^{10} CFU/g koncentráció értékű készítményt a szennyeződés gócpontjaiba injektáltuk, a szennyezett talaj tömegéhez viszonyítottan 0,75 % mennyiségben. Az injektálás részben a talaj felszín alatti de talajvízszint feletti 3-4 méteres zónában több pontban szétszórtan és a 4-5 méteres talajvízszint alatti tartományba permeábilis aktív részfalként került alkalmazásra. Az eredmények alapján a 120-ik napon történt ellenőrzéskor már megállapítható volt, hogy a talajszennyezés magas klóratomszámú szennyeződésének koncentrációja 375 mg/kg-ra csökkent, az alacsonyabb klóratomszámú szennyeződésre biodegradált anyag helyben stabilizálódott, és a permeábilis aktív részfal 92 %-os hatékonysággal stabilan megkötötte a vízáramban lévő szennyezőanyagokat, megakadályozva a szennyeződés továbbterjedését.

Szabadalmi igénypontok:

1. Eljárás mikrobiális oltóanyagok steril hordozóhoz kötött életképesség megőrző előállításra, tárolására és alkalmazásaira azzal jellemezve, hogy a hordozó csontszén, melyet 0,001 mm és 10 mm szemcseméret tartomány közötti állati eredetű csontból 500 Celsius fok feletti maghőmérsékleten szénesezési eljárással állítunk elő, 35 Celsius fok alatti hőmérsékletre hűtünk, majd a szilárd fázisú fermentációs eljárással előállított mikrobiológiai anyaggal kezeljük.
2. Az 1. igénypont szerinti tárolási eljárás azzal jellemezve, hogy a szilárd fermentációval előállított és a hordozó felületén lévő illetve a belső steril terébe juttatott biológiailag aktív mikrobiális oltóanyagot spórázásra készítetjük, mely szerint az anyag nedvességtartalmát immobilizálás céljából 35 Celsius fok anyaghőmérséklet alatti hőmérsékleten 35 súlyszázalék alá csökkentjük.
3. Az 1.-2. igénypontok bármelyike szerinti eljárás fogatosítási módja azzal jellemezve, hogy a mikroorganizmusok olyan tenyészetét vagy tenyészeit szelektáljuk és kötjük a hordozóhoz, melyek nem patogén tulajdonságúak.
4. Az 1.-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás fogatosítási módja azzal jellemezve, hogy egy vagy több mikroorganizmus tenyészeit szelektáljuk és együttesen vagy külön – külön szilárd fermentációs eljárással a hordozóhoz kötjük.
5. A 6. igénypont szerinti eljárás előnyös fogatosítási módja azzal jellemezve, hogy a mikroorganizmusokat két lépcsős – folyadék fázisú és szilárd szubsztrát – fermentációs eljárással állítjuk elő.
6. Az 1.-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás alkalmazás fogatosítási módja azzal jellemezve, hogy olyan talajlakó mikroorganizmus tenyészeit szelektáljuk melyek együttesen vagy külön – külön kötve a hordozóhoz növényi talajpatogének ellen is alkalmazhatók.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a talaj foszfor feltöltésre is alkalmazható.
8. Az 1.-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás talaj revitalizációs alkalmazás foganatosítási módja azzal jellemezve, hogy olyan talajlakó mikroorganizmus tenyészeteket szelektáljuk melyek együttesen vagy külön – külön hordozóhoz kötve a szennyeződések biológiai bontására és/vagy szennyeződések fiziko-kémiai stabilizált megkötésére is alkalmazhatók.

K I V O N A T

Eljárás foszfor tartalmú hordozóhoz kötött mikroorganizmusok szilárd fermentációjára, granulált készítményének előállítására, tárolására és alkalmazásaira

Bejelentő: Edward Soméus

Bejelentés napja: 2003 június 23.

A találmány tárgya eljárás mikroorganizmusok foszfor tartalmú szilárd felületű állati eredetű csontszén hordozóhoz kötött granulált készítményének előállítására, tárolására és alkalmazásaira vonatkozik, mely szerint adalékanyagok hozzáadásával vagy adalékanyagok nélkül nem patogén mikroorganizmusokat kötünk a hordozóhoz, majd életképesség megőrző módon 35 Celsius fok alatti hőmérsékleten immobilizáljuk, hűtés nélkül tároljuk, és aktiválva alkalmazzuk. A találmány szerinti 0,001 mm és 10 mm szemcseméret tartomány közötti granulátum készítmény lényege, hogy az állati eredetű csontszén 500 Celsius fok feletti anyag maghőmérsékleten állítjuk elő, hűtjük majd mikrobiológiai anyaggal folyadék fázis és szilárd szubsztrát fermentációval egy vagy két lépcsőben kezeljük és spóráztatjuk, majd alkalmazás során víz és/vagy tápanyag hozzáadásával ismét aktiváljuk.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.